

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

18.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 8月27日

REC'D 05 OCT 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第240642号

WIPO

PCT

出願人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団

JP00/05545

10/069541

EU



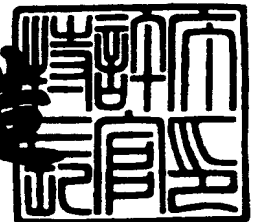
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3075997

【書類名】 特許願

【整理番号】 A011P12

【提出日】 平成11年 8月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県逗子市沼間 2 - 3 - 1 - 4 1 1

【氏名】 芳賀 達也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都保谷市ひばりヶ丘北 4 - 1 - 6 リズひばりヶ丘 1  
0 1

【氏名】 奥田 隆志

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高親和性コリントランスポーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 3】 請求項 2 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来の DNA。

【請求項 4】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 5】 配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 6】 請求項 5 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来の DNA。

【請求項 7】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 8】 配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこ

これらの配列の一部または全部を含むDNA。

【請求項 9】 請求項 8 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来の DNA。

【請求項 10】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなる線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 11】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 12】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 13】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 14】 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 15】 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 16】 請求項 10 又は 11 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 17】 請求項 12 又は 13 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 18】 請求項 14 又は 15 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 19】 被検物質の存在下、請求項 10～15 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 0】 被検物質の存在下、請求項 1 0～1 5 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 1】 被検物質を非ヒト動物に投与し、請求項 1 0～1 5 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 2 2】 高親和性コリントランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 7～9 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

【請求項 2 3】 高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 7～9 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 2 2 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

【請求項 2 4】 請求項 2 2 又は 2 3 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により調整されたことを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞。

【請求項 2 5】 高親和性コリントランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 2 6】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 2 5 記載の非ヒト動物。

【請求項 2 7】 請求項 2 5 又は 2 6 記載の非ヒト動物に被検物質を投与することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質

又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

全身の臓器に分布し、内分泌系と並んでエネルギー代謝、循環、呼吸及び生殖など生体にとって最も基本的な機能を調節する神経系である自律神経は、アドレナリン作動性とコリン作動性に分類される。交感神経の節後繊維以外のすべての自律神経繊維、運動神経繊維、交感神経のうち汗腺・血管拡張繊維はコリン作動性神経であり、運動・自律神経機能に重要である。脳にも存在するコリン作動性神経は、脳の認知機能に重要であり、アルツハイマー病では変性することが知られている。また、コリン作動性神経では、コリン生合成能を欠いているため、アセチルコリン分解産物のコリンはシナプス前部に存在する高親和性コリントランスポーターによって細胞内に取り込まれ、アセチルコリン合成に再利用される。この高親和性コリンの取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であり、シナプス伝達の効率を調節すると考えられている (J. Neurochem. 18, 781-798, 1971、Science 178, 626-628, 1972、Biochem. Biophys. Acta 291, 564-575, 1973、Mol. Pharmacol. 9, 630-639, 1973、J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 86-94, 1975、J. Neurochem. 30, 15-21, 1978、J. Neurochem. 44, 11-24, 1985、J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993、J. Neurochem. 20, 581-593, 1973、Eur. J. Pharmacol. 102, 369-370, 1984)。従来、主要な神経伝達物質トランスポーターのほとんどの cDNA は単離されているが、生理的に重要である高親和性コリントランスポーターの cDNA は同定されていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

コリン作動性神経に局在し、アセチルコリンの前駆体であるコリンを細胞内に取り込む作用をするタンパク質の存在がこれまでに予想されており、このタンパク質である高親和性コリントランスポーターの分子的性質は不明であった。本発明の課題は、生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供することにある。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ゲノム・プロジェクトの情報 (Science 282, 2012-2018, 1998) を利用して、線虫 *C. elegans* のゲノム配列から予測される  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーター cDNA を 1 つひとつクローニングし、そのそれぞれについてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターの cDNA (cho-1) を同定し、この cDNA との塩基配列の相同性を指標にラット脊髄から相同分子 (CHT1) をクローニングした。この CHT1 は神経伝達物質トランスポーター (J. Neurochem. 71, 1785-1803, 1998) との相同性をもたないが、 $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーに属する分子 (Nature 330, 379-381, 1987) に対して 20-25% の相同性を有していた。

## 【0005】

ノザン解析の結果、脊髄、前脳基底部、線条体、脳幹に局限して CHT1 の転写産物が確認され、CHT1 はコリン作動性神経で発現していると考えられたので、CHT1 をアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させると、 $\text{Na}^+$  依存的で、ヘミコリニウム-3 で完全に阻害されるコリン取り込み活性が観察された。これらの結果から、CHT1 が高親和性コリントランスポーター活性を有することを見い出した。また、本発明者らは、ヒトコリントランスポーター cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定し、その発現産物が高親和性コリン取り込み活性を有することを確認した。本発明は以上のようにして完成するに至ったものである。

【0006】

すなわち本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質(請求項1)や、配列番号1に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA(請求項2)や、請求項2記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来のDNA(請求項3)や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質(請求項4)や、配列番号3に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA(請求項5)や、請求項5記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来のDNA(請求項6)や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質(請求項7)や、配列番号5に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA(請求項8)や、請求項8記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来のDNA(請求項9)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質(請求項10)や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリ



ントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 11）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 12）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 13）や、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 14）や、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 15）に関する。

## 【0007】

また本発明は、請求項 10 又は 11 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 16）や、請求項 12 又は 13 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 17）や、請求項 14 又は 15 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項 18）に関する。

## 【0008】

さらに本発明は、被検物質の存在下、請求項 10～15 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 19）や、被検物質の存在下、請求項 10～15 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 20）や、被検物質を非ヒト動物に投与し、請求項 10～15 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタン

パク質を発現することができる細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 1）や、高親和性コリントランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 7～9 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 2 2）や、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 7～9 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 2 2 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 2 3）や、請求項 2 2 又は 2 3 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により調整されたことを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞（請求項 2 4）や、高親和性コリントランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物（請求項 2 5）や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 2 5 記載の非ヒト動物（請求項 2 6）や、請求項 2 5 又は 2 6 記載の非ヒト動物に被検物質を投与することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 2 7）に関する。

【0 0 0 9】

【発明の実施の形態】

本発明の配列番号 1 に記載される線虫高親和性コリントランスポーターの c DNA は、C. elegans ゲノム・プロジェクトから  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーターファミリーのメンバーと予測される完全長の候補 c DNA から調製したそれぞれの c RNA を、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し高親和性コリン取り込みを調べることにより得ることができる。その際、哺乳類の脳シナプトソームでは高親和性コリン取り込みは  $1 \mu\text{M}$  の HC 3 で完全に阻害される ( $K_i = 10 - 100 \text{ nM}$ ) のに対し、あらゆる細胞に分布している低親和性コリン取り込みはより高

濃度のHC3でのみ阻害される ( $K_i = 50 \mu\text{M}$ ) ことから、 $1 \mu\text{M}$ のヘミコリニウム-3 (hemicholinium-3; HC3) に対する感受性を高親和性コリン取り込みの判断基準とすることができる。例えば、以下のようにして*C. elegans*の候補cDNAから目的とする遺伝子の同定、発現、局在を確かめることができる。

#### 【0010】

高親和性コリン取り込みにおいて、C48D1.3と予測された遺伝子に相当するcDNAは $1 \mu\text{M}$ のHC3で阻害される有意なコリン取り込みを促すことが分かった。図1には、C48D1.3 cRNAまたは水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込み結果が示されている。図1中、黒と白のカラムは $1 \mu\text{M}$ のHC3の非存在下、存在下でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均 $\pm$ SEM ( $n = 6 \sim 8$  卵母細胞) で表示されている。また図2には、 $\text{Na}^+$ のコリン取り込みに対する効果が示され、黒カラムは標準溶液中で測定したコリン取り込みを示し ( $[\text{Na}^+] = 100 \text{ mM}$ )、白カラムは $\text{Na}^+$ 非存在下でのコリン取り込みを示している ( $\text{Na}^+$ は $\text{Li}^+$ に置き換えられた)。さらに図3にはHC3によるコリン取り込みの阻害が示されている。かかる図2、3から、この取り込みは $\text{Na}^+$ 依存性であり、HC3の $K_i$ は $50 \text{ nM}$ と推定された。このcDNAクローンはcho-1 (high-affinity choline transporter-1) と名付けられた。

#### 【0011】

cDNAとゲノムの塩基配列の比較により、cho-1遺伝子は9つのエクソンからなることが分かった。cho-1 cDNAの塩基配列から予想されるタンパク質は576アミノ酸残基であり (図4参照)、この配列番号2に示されるタンパク質は常法により作製することができる。また、入手できるデータベースを検索したところcho-1のアミノ酸配列は $\text{Na}^+$ 依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーに対して弱いながら有意な相同性を示した。疎水性分析と他のトランスポーターとの比較から12回膜貫通領域をもつことが示唆される (図7参照)。

#### 【0012】

次に、*C. elegans*の神経系でcho-1を発現している細胞を同定するために、cho

-1 遺伝子上流 5.1 kb の領域を融合させたグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を線虫に導入し、cho-1::gfp を発現している神経細胞の分布を調べた。cho-1::gfp レポーター DNA を染色体外に保持している L1 幼虫の写真を図 5 として示す (スケールバー; 50  $\mu$ m)。図 5 中、矢頭は神経環を示す。腹部神経索では GFP はコリン作動性運動神経においてのみ発現しているが、おそらく染色体外のレポーター DNA が欠失したためにいくつかの DA、DB 神経細胞は GFP を発現していない。これは cho-1 がコリン作動性神経の高親和性コリントランスポーターであることを裏付けている。

### 【0013】

本発明の配列番号 3 に記載されるラット高親和性コリントランスポーターの cDNA は、例えば次のようにして調製することができる。脊椎動物の cho-1 相同分子に注目し、cho-1 から予想されるアミノ酸配列でデータベースを検索し、ヒトの genomic survey sequence (GSS) で一つの候補 (GenBank accession number AQ316435) を同定した。このヒトのゲノム DNA と cho-1 の塩基配列の相同性に基づき、縮重プライマーを用いた PCR でラット脊髄 cDNA から cDNA 断片を増幅した。この断片を使ってラット脊髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングし陽性の cDNA クローンを得た。最長の読み枠の塩基配列から cho-1 と 51% の同一性および 70% の類似性を示す 580 アミノ酸残基のタンパク質が予想された (図 4 参照)。このラット cDNA クローンは CHT1 と名付けられた。図 4 には、ラット CHT1 と *C. elegans* CHO-1 のそれぞれのアミノ酸配列が、同一残基は黒囲みで、類似残基はグレー囲みで表示されている。予想される膜貫通領域 I-XII は下線が引かれている。この配列番号 4 で示されるタンパク質は常法により作製することができる。

### 【0014】

上記 CHT1 のアミノ酸配列は  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーと有意な相同性を有する (20-25%)。遺伝研究所 (三島、日本) のプログラム CLUSTALW を用いて neighbor-joining 法で作製した  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を図 6 に示す。図 6 には、ラット CHT1 に対してそれぞれのタンパク質が含む同一のアミノ酸の割合 % が右側

に示されている。一方、酵母のコリントランスポーター (J. Biol. Chem. 265, 15996-16003, 1990)、当初は高親和性コリントランスポーターと報告されていたクレアチントランスポーター (Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 637-645, 1994)、及び他の神経伝達物質トランスポーターとは相同性をもたない。

#### 【0015】

CHT1の予想されるトポロジーはC. elegansのCHO-1と本質的に同じであると考えられ、ラットCHT1の予想されるトポロジーを図7に示す。図7中、黒の円は同一残基、グレーの円はよく保存された残基、白の円は類似していない残基を示す。枝線は予想される糖鎖付加部位を示す。円中のPはタンパク質キナーゼCによるリン酸化予想部位を示す。

#### 【0016】

次に、ノザン解析やin situ ハイブリダイゼーションでCHT1 mRNAの発現分布を調べた。ラットのさまざまな組織のノザン解析からおよそ5 kbの長さの転写産物の発現を確認した。図8には、ラット組織でのCHT1 mRNA転写産物のノザン解析の結果が示されている。また、RNAの標準 (0.24-9.5 kb; GIBCO BRL)の長さが左に示されている。図8からわかるように、前脳基底部や脳幹、脊髄で多く、線条体では少なかった。これらの組織はいずれもコリン作動性神経を含むことが知られている。一方、脳の他の領域や非神経系の組織では転写産物は確認されなかった。

#### 【0017】

これらの結果と一致して、in situ ハイブリダイゼーションでは線条体、前脳基底部の細胞群、脊髄前角を含む主要なコリン作動性神経の細胞集団でCHT1 mRNAの発現が確認された。図9及び図10 (スケールバー; 1 mm) には、ラット脳及び脊髄におけるCHT1転写産物のin situ ハイブリダイゼーション解析に関する、ジゴキシゲニンでラベルされたアンチセンスのcRNAプローブにハイブリダイズされた明視野での切片の顕微鏡写真が図示されている。図9から、CHT1 mRNA転写産物はvertical及びhorizontal limbs of the diagonal band (VDB, HDB), medial septal nucleus (MS), caudate and putamen (CPu), olfactory tubercle (Tu)で検出されていることが、図10から脊髄では前角(VH)で発現

が観察されることがわかる。また、小胞アセチルコリントランスポーターのプロープでハイブリダイズされた隣りの切片も本質的に同様な分布を示した。この発現分布はすでに報告されているコリンアセチル基転移酵素や小胞アセチルコリントランスポーターの分布と本質的に同じである。これらの結果は CHT 1 mRNA がコリン作動性神経に局限して発現していることを示している。

#### 【0018】

次に CHT 1 によるコリン取り込みをアフリカツメガエル卵母細胞で調べた。CHT 1 cRNA を注入した卵母細胞のコリン取り込みは水を注入したコントロールよりも 2-4 倍高かった。図 11 には、CHT 1 cRNA または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込み結果が示されている。図 11 中、黒と白のカラムは 100 mM NaCl あるいは LiCl を含む標準溶液でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均  $\pm$  SEM ( $n = 6 \sim 8$  卵母細胞) で表示されている。またコリン濃度のコリン取り込みに対する効果が図 12 に示されている。図 12 においては、水を注入した卵母細胞の取り込みを cRNA のそれから差し引いて、CHT 1 によるコリン取り込みを算出し、取り込みはミカエリス・メンテンの曲線に近似させている。図 12 に示されるように、CHT 1 のコリン取り込みはコリン濃度を増加させると飽和した ( $K_m = 2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ )。

#### 【0019】

次に、HC 3 によるコリン取り込みの阻害の結果を図 13 に示す。図 13 から、コントロールの内因性のコリン取り込みの  $K_m$  は  $10 \mu\text{M}$  より高く、CHT 1 のコリン取り込みは  $0.1 \mu\text{M}$  の HC 3 で完全に阻害される ( $K_i = 2-3 \text{ nM}$ ) のに対して、コントロールでは  $10 \mu\text{M}$  の HC 3 でわずかしき阻害されないことがわかる。図 14 に示されるように、CHT 1 のコリン取り込みのイオン依存性を調べると  $\text{Na}^+$  だけでなく  $\text{Cl}^-$  依存的事であることがわかった。黒と白のカラムは水を注入した卵母細胞のコリン取り込み、cRNA を注入した卵母細胞のコリン取り込みをそれぞれ示す (標準溶液中の 100 mM NaCl は図で示されているそれぞれの 100 mM の塩で置換)。これらの結果は脳シナプトソームの高親和性コリン取り込みから期待される特性 (コリンに対する高い親和性、HC 3 に対する高

い感受性、 $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ 依存性)をCHT 1がもつことを示している (J. Neurochem. 27, 93-99, 1976)。

#### 【0020】

また、CHT 1 cDNAとベクター (コントロール) をそれぞれ導入したCOS 7細胞から調製した膜の $[\text{}^3\text{H}]$  HC 3結合活性を調べた。結果を図15に示す。図15からわかるように、CHT 1を発現させた細胞の膜では $\text{Na}^+$ 依存的な $[\text{}^3\text{H}]$  HC 3結合が観察されたが、コントロールの膜では観察されなかった。次に、特異的 $[\text{}^3\text{H}]$  HC 3結合の飽和解析を行った。図16に示されるように、平衡解離定数(Kd)は $1.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$  ( $n=3$ ) であると推定された。この値は脳シナプトソームで報告されている数値と類似していた (J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993, Life Sci. 35, 2335-2343, 1984, Brain Res. 348, 321-330, 1985)。さらに、HC 3、コリン(Cho)、アセチルコリン(Ach)による特異的 $[\text{}^3\text{H}]$  HC 3結合の置換について検討した。アセチルコリンは $1 \mu\text{M}$ フィソスチグミン存在下で測定した。結果を図17に示す。図17から、 $[\text{}^3\text{H}]$  HC 3の特異的結合はアセチルコリンよりも約10倍以上低い濃度で置換されることがわかる。これらの結果はCHT 1が高親和性コリントランスポーターであるだけでなくHC 3結合部位でもあることを示している。

#### 【0021】

本発明の配列番号5に記載されるヒト高親和性コリントランスポーターのcDNAは、例えば次のようにして調製することができる。線虫 (*C. elegans*) CHO-1のアミノ酸配列でデータベース検索を行い、有意な相同性がある特定のヒトゲノムDNA断片の配列 (human genomic survey sequenceの1クローンであるR-107P12; GenBank accession number AQ316435) を見出し、かかるDNA断片の塩基配列を基にPCRの遺伝子特異的プライマーを設計した。ヒト全脳のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA (クローンテック社製) と付属のアダプタープライマーを用いて5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) 及び3' - RACEを行った。この得られたPCR産物をPCR用クローニングベクターにクローン化し、挿入DNAの塩基配列を決定した。また、このDNA配列から予想されるアミノ酸配列は配列番号6で示されている。かかる配列番号6で

示されるヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、配列番号5に示されるDNA配列情報に基づいて常法により作製することができる。

#### 【0022】

本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質としては、上記具体的に開示した配列番号2、4及び6で示されるものの他に、配列番号2、4及び6で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質も包含され、これらは公知の方法で調製することができる。また、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAとしては、上記具体的に開示された配列番号1、3及び5で示されるものの他に、配列番号2、4及び6で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAや、これら遺伝子DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNAも包含され、これらは公知の方法で調製することができる。

#### 【0023】

ところで、コリン作動性神経は学習・記憶に非常に重要な役割を果たしている。この神経の障害と痴呆の重篤さは相関する。アセチルコリン合成の律速段階は高親和性コリン取り込みであり、その活性は神経活動や種々の刺激で制御されている。さらにアルツハイマー病患者の脳では高親和性コリン取り込みやHC3結合活性が亢進している (Trends Neurosci. 15, 117-122, 1992, Ann. NY Acad. Sci. 777, 197-204, 1996, J. Neurochem. 69, 2441-2451, 1997)。上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAや、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のクローニングはこれらの制御の分子機構を明らかにしたり、アルツハイマー病の新しい療法を開発したりするために重要である。

#### 【0024】



本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体は、前記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を抗原として用いる、常法により作製することができ、モノクローナル抗体がその特異性の点で好ましい。かかるモノクローナル抗体は、例えば、高親和性コリントランスポーターの制御の分子機構を明らかにする上で有用である。

## 【0025】

また、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子DNAや、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を用いると、アルツハイマー症の治療に有用な薬剤、すなわち高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることができる。本発明におけるスクリーニング方法としては、被検物質の存在下、上記本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を評価する方法や、被検物質の存在下、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価する方法や、被検物質を非ヒト動物に投与し、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価する方法を例示することができる。

## 【0026】

また、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAの全部あるいは一部を用いると、アルツハイマー症等の遺伝子治療に有効な細胞を調製することができる。本発明におけるこれら細胞の調製方法としては、高親和性コリントランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、上記本発明の遺伝子又はDNAの全部あるいは一部をトランスフェクション等により導入し、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞を得る方法を挙げることができ、特に、かかる高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞としては、上記遺伝子又はDNA等が染色体にインテグレイ

トされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞を用いることが好ましい。

## 【0027】

本発明において、高親和性トランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の高親和性トランスポーター遺伝子の一部もしくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、高親和性トランスポーターを発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、高親和性トランスポーター遺伝子機能が染色体上で異常発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べて高親和性トランスポーター活性を有するタンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

## 【0028】

本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記高親和性トランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同種の動物を意味し、同腹の動物が好ましい。そして、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体マウスには、高親和性トランスポーター欠損型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体マウスにおける欠損型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができる。かかる高親和性トランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物の作製方法を、高親和性トランスポーターが欠損したノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

## 【0029】

例えば、高親和性トランスポーター遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち高親和性トランスポーターノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、高親和性トランスポーター遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた高親和性トランスポーター遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの高親和性トランスポーター遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアト

キシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

#### 【0030】

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の高親和性トランスポーターノックアウトマウスを作製することができる。また、高親和性トランスポーターノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

#### 【0031】

さらに、上記高親和性トランスポーターノックアウトマウスに被検物質を投与し、該ノックアウトマウスにおける高親和性トランスポーター活性等を評価することにより、高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることもできる。

#### 【0032】

以下上記の各種実験における実験方法等をさらに詳細に説明する。

(トランスポーターcDNAのクローニング)

線虫コリントランスポーターの候補のcDNAは、種々の発生段階の線虫混合物のpoly(A)+RNAから逆転写PCR及び3' RACEで単離した。プロトコール

に従ってMarathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit (クローンテック社製) を用いた。PCRの順方向のプライマーはC. elegansゲノム・プロジェクトから入手したDNA塩基配列に基いて、予測遺伝子の暫定的な翻訳開始点で設計した。増幅されたPCR産物を改変pSPUTKベクター (ストラタジーン社製) のNco I (平滑化) 部位とNot I部位にサブクローニングし、挿入DNAの塩基配列を決定した。ラットのCHT1 cDNAはGeneTrapper cDNA Positive Selection System (ギブコバイオラッドラボレトリー: GIBCO BRL) をプロトコール通りに使用してラット脊髄cDNAライブラリーから単離した。用いたプライマーは縮重PCRで得られたcDNA断片の塩基配列から設計した。得られたcDNAクローンを解析した結果陽性だったクローンをpSPUTKベクター及びpcDNA3.1+ ベクター (インビトロジェン社製) にサブクローニングした。

#### 【0033】

(アフリカツメガエル卵母細胞での発現)

cRNAはキャップアナログ存在下でSP6またはT7RNAポリメラーゼを用いてインビトロで合成した。キャップ化RNA 20-30 ngをアフリカツメガエル卵母細胞 (ステージV-VI) に微量注入した。取り込み測定は文献 (Nature 360, 467-471, 1992) に述べられている方法と本質的に同様に行った。コリン取り込みはRNA注入の2-3日後に0.75 mlの標準液中 (0.01-1  $\mu$ Mの [<sup>3</sup>H]-コリン、100 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのMgCl<sub>2</sub>、1 mMのCaCl<sub>2</sub>、10 mMのHEPES、5 mMのTris: pH 7.4) の卵母細胞 (6-8個) を用いて30-60分間行った。取り込み後の卵母細胞は10%のSDSで可溶化して、液体シンチレーションカウンターで [<sup>3</sup>H] 量を測定した。

#### 【0034】

(GFC発現コンストラクト)

cho-1::gfpの転写融合コンストラクトは文献 (Gene 212, 127-135, 1998) で述べられている方法と同様にPCRで作製した。核移行シグナル配列 (NLS) の下流にあるグリーン蛍光タンパク質 (GFP) をコードする遺伝子をcho-1 翻訳開始点からアミノ酸3残基分下流の位置に読み枠が合うように挿入した。NL

Sとgfp遺伝子はpPD104.53ベクターから増幅した。cho-1翻訳開始点から5.1 kb上流領域を調製するためにcho-1の最初のアミノ酸3残基分を含むように設計したPCRプライマーを用いた。文献(EMBO J. 10, 3959-3970, 1991)で述べられている方法と同様にrol-6(su1006)マーカーと作製したDNAを線虫の生殖器官に同時注入した。

# 【0035】

## (ノザン解析)

ラットのさまざまな組織から調製した6  $\mu$ gのpoly(A)+RNAをホルムアルデヒド-アガロース電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した。次にハイブリダイゼーション溶液(最終濃度で50%のホルムアミド、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ Denhardt's solution、0.5%のSDS、100  $\mu$ g/mlのsalmon sperm DNAを含む溶液)中で、ランダム・プライム法で $[^{32}\text{P}]$ ラベルしたCHT1 cDNA断片に対して42 $^{\circ}\text{C}$ で16時間ハイブリダイズさせた。ナイロン膜は最終条件(0.1 $\times$ SSPE、0.1%のSDS:65 $^{\circ}\text{C}$ )で洗浄後、エンハンシングスクリーン(enhancing screen)と共に7日間オートラジオグラフィーを行った。

# 【0036】

## (in situ ハイブリダイゼーション)

ジゴキシゲニンでラベルしたアンチセンスの転写産物はin vitroで合成した。転写産物は平均長200~400塩基対になるまでアルカリ分解を行った。新鮮凍結組織のクリオスタット切片(10~20  $\mu$ m)を用いた。ハイブリダイゼーションは1 $\times$ Denhardt's溶液[最終濃度で50 mMのTris-HCl(pH 8.0)、2.5 mMのEDTA、0.3 MのNaCl、50%のホルムアミド、10%のデキストランサルフェート、1 mg/mlの大腸菌(E. coli)のtRNAを含む溶液]に溶解させたラベル化cRNAプローブ(およそ1  $\mu$ g/ml)で45 $^{\circ}\text{C}$ で20時間行った。次に切片を2 $\times$ SSC/50%のホルムアミド中で2回、1 $\times$ SSC/50%のホルムアミド中で1回、いずれも45 $^{\circ}\text{C}$ で洗浄した。ハイブリダイズしたプローブを抗ジゴキシゲニンFab断片(Boehringer-Mannheim)とNBT/BCIP基質を用いて可視化した。切片は基質溶液中で24~48時間反応させた。

【0037】

(結合実験)

[<sup>3</sup>H] ヘミコリニウム-3 (HC3; 128 Ci/mmol) は NEN Life Science Products から入手した。pcDNA3.1-CHT1あるいはpcDNA3.1をそれぞれCOS 7細胞に一過性に発現させた。プロトコールに従ってTransFast Reagent (プロメガ社製) を導入し用いた。膜調製は、細胞を0.32 Mスクロース中でホモジュナイズし、200,000 gで1時間遠心後、沈澱物を懸濁させた。結合実験は他で述べられている方法と本質的に同様に行った。特異的結合量は10 μMのHC3存在下で決定した非特異的結合量を全体の結合量から差し引いて計算した。飽和結合実験のデータから特異的な [<sup>3</sup>H] HC3 結合量を非線形近似で解析してK<sub>d</sub>値を算出した。

【0038】

【発明の効果】

本発明によると、生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子DNAを提供することができる。また、それらタンパク質や遺伝子DNAを用いることにより、アルツハイマー症の予防や治療に有用な物質をスクリーニングすることや、遺伝子治療に有用な細胞を調製することができる。

【0039】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; High-affinity choline transporter

&lt;130&gt; A011P12

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1731

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1731)

<223> choline transporter from *C. elegans*

<400> 1

atg gcc gac tta ttg ggt atc gtg gcc att gtg ttc ttc tac gtg ctc 48

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu

1

5

10

15

att ctt gtc gtt gga ata tgg gcg ggt aga aaa tcg aaa agt tca aaa 96

Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys

20

25

30

gag ctt gaa tca gaa gcc ggc gcg gcg acg gaa gag gtg atg tta gct 144

Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala

35

40

45

ggg aga aac atc gga act ctt gtc gga att ttc aca atg act gcc acg 192

Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr

50

55

60

tgg gtt ggc ggt gct tat atc aat gga acc gcc gag gct ctg tat aat 240

Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn

65

70

75

80

gga ggt ctc ctt gga tgt cag gct cca gtt gga tat gca att tcc ctt 288

Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu

85

90

95

gtt atg gga gga cta ctt ttc gca aag aaa atg cga gaa gaa gga tat 336

Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr

100

105

110

att aca atg ctc gat cct ttt cag cac aaa tat ggc caa cga atc ggt 384

Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly

115

120

125

ggc ttg atg tat gtt cca gca ctt ctt ggt gaa aca ttc tgg aca gca 432

Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala

130

135

140

gcc att ctt tcg gca ctt ggt gca aca ctg tcg gta att ctt gga atc 480

Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile

145

150

155

160



gac atg aat gca tca gtg acc ctg tgc gcc tgt att gcc gta ttc tac 528  
Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr

165

170

175

aca ttc acc ggt gga tac tat gca gtc gcg tac act gac gtc gtt caa 576  
Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln

180

185

190

cta ttt tgc att ttc gtc ggt ttg tgg gtt tgc gtg ccg gcg gct atg 624  
Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met

195

200

205

gtg cat gat ggt gcg aag gat att tcc agg aat gca ggc gac tgg att 672  
Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile

210

215

220

gga gag att gga gga ttc aaa gaa aca tct ctc tgg att gat tgc atg 720  
Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met

225

230

235

240

ctt ctc ctt gtc ttt gga gga att cca tgg caa gtg tac ttc caa aga 768  
Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg

245

250

255

gtt ctc tcc tca aaa act gct cat gga gca cag acg ttg tgc ttt gtg 816  
Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val

260

265

270

gcg ggc gtc gga tgc att ctc atg gcg att cca cca gcg ttg atc ggt 864

Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly

275

280

285

gca att gcc agg aac aca gac tgg aga atg act gat tat tcc cca tgg 912

Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp

290

295

300

aac aat gga act aag gtc gaa tcg att cca ccg gat aag aga aac atg 960

Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met

305

310

315

320

gtg gtc ccg ttg gta ttc cag tat ctt acg cca aga tgg gtc gcc ttt 1008

Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe

325

330

335

att gga ctc ggc gca gtg tcg gct gct gta atg tca tct gca gat tca 1056

Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser

340

345

350

tct gta cta tca gca gca tca atg ttt gct cac aac atc tgg aag ctc 1104

Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu

355

360

365

aca att cgc cct cac gcg tct gaa aaa gaa gtg ata att gtg atg aga 1152

Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg

370

375

380

ata gcc atc atc tgt gtt ggt atc atg gca acc atc atg gca ctt acc 1200

Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr  
385 390 395 400

att caa tcc atc tat ggg ctt tgg tat ctt tgt gca gat ttg gtc tac 1248  
Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr  
405 410 415

gtc ata ctc ttc cct caa cta tta tgt gtt gta tat atg cca cgt agc 1296  
Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser  
420 425 430

aat acg tat ggc tca ttg gct ggc tat gca gtc ggt ctt gtg ctc cgt 1344  
Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg  
435 440 445

ttg att gga ggc gag cca ctt gta tcg ctg cca gcg ttc ttc cat tat 1392  
Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr  
450 455 460

cca atg tat acg gat ggg gta cag tat ttc cca ttc agg aca act gct 1440  
Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala  
465 470 475 480

atg tta tct tca atg gct act atc tac att gta tca ata caa tcg gag 1488  
Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu  
485 490 495

aag ctg ttc aaa tcg gga cgt ttg tct ccg gag tgg gac gta atg ggt 1536  
Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly

500

505

510

tgt gta gtg aat att ccg ata gat cat gta ccc ctt ccg tca gat gta 1584

Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val

515

520

525

tcg ttt gct gtt agt agt gag acc ttg aat atg aag gct cca aac gga 1632

Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly

530

535

540

aca ccg gct cca gta cat ccg aac caa cag ccg tct gat gaa aat aca 1680

Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr

545

550

555

560

tta tta cat cca tat tcg gac caa agt tat tat tcc aca aat agc aat 1728

Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn

565

570

575

taa

1731

<210> 2

<211> 576

<212> PRT

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 2

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu

1

5

10

15

Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys

20

25

30

Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala

35

40

45

Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr

50

55

60

Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn

65

70

75

80

Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu

85

90

95

Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr

100

105

110

Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly

115

120

125

Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala

130

135

140

Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile

145

150

155

160

Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr

165

170

175

Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln

180

185

190

Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met

195

200

205

Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile

210

215

220

Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met

225

230

235

240

Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg

245

250

255

Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val

260

265

270

Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly

275

280

285

Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp

290

295

300

Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met

305

310

315

320

Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe

325

330

335

Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser

340

345

350

Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu

355

360

365

Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg

370

375

380

Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr

385

390

395

400

Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr

405

410

415

Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser

420

425

430

Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg

435

440

445

Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr

450

455

460

Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala

465	470	475	480
Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu			
485	490	495	
Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly			
500	505	510	
Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val			
515	520	525	
Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly			
530	535	540	
Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr			
545	550	555	560
Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn			
565	570	575	

<210> 3

<211> 1743

<212> DNA

<213> rat

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)



<223> choline transporter from rat

<400> 3

atg cct ttc cat gta gaa gga cta gta gcg att atc ctg ttc tac ctt 48

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1

5

10

15

ctt ata ttt ctg gtt gga ata tgg gct gca tgg aaa acc aaa aac agc 96

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20

25

30

ggt aat gca gaa gaa cgc agc gaa gcc atc ata gtt ggg ggc cga gac 144

Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

att ggt ttg ttg gtt ggt ggt ttt acc atg aca gcc acc tgg gtt gga 192

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

gga ggt tac atc aac ggg aca gct gaa gca gtt tat ggg cca ggt tgt 240

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65

70

75

80

ggt cta gct tgg gct cag gca ccc att gga tat tct ctg agt ctg att 288

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

tta ggt ggc ctg ttt ttt gca aaa cct atg cgt tcc aag gga tat gtg 336

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

act atg tta gac ccg ttt caa cag atc tat gga aag cgc atg ggt ggg 384

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

ctg ctg ttc atc cct gca ctg atg gga gag atg ttc tgg gct gca gca 432

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

att ttc tct gca tta ggg gct acc atc agc gta atc att gat gtg gat 480

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

gtg aac ata tcg gtc att gtc tcc gca ctc att gcc att ctt tat acc 528

Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr

165

170

175

ctc gtg gga ggg ctc tac tct gtg gca tat act gat gtt gta cag cta 576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

ttc tgc att ttt ata gga ttg tgg atc agt gtc cca ttt gcc ctg tca 624

Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

cat cct gta gtc acc gac att gga ttc act gct gtg cat gct aaa tac 672

His Pro Val Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

cag agt ccc tgg ctg gga acc att gaa tca gtt gaa gtc tac acc tgg 720  
Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp  
225 230 235 240

ctt gat aat ttt ctg ttg ttg atg ctg ggt gga ata cca tgg caa gcc 768  
Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala  
245 250 255

tac ttc cag agg gtc ctc tct tca tgc tca gcg acc tat gct cag gtg 816  
Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val  
260 265 270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttt ggg tgc ctg gtg atg gct cta cca gcc 864  
Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala  
275 280 285

att tgc att ggg gcc att gga gcc tcc aca gac tgg aac caa act gca 912  
Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
290 295 300

tat ggg ttt cca gat ccc aag acc aag gag gaa gca gac atg att ctc 960  
Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
305 310 315 320

ccg att gtt cta cag tac ctc tgc cct gtg tac att tcc ttc ttt ggg 1008  
Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
325 330 335

ctt ggt gct gtt tct gct gct gtc atg tcc tcg gct gac tca tcc atc 1056  
Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

cta tca gca agt tcc atg ttt gct cgg aat atc tac cag ctt tcc ttc 1104  
Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

aga caa aat gca tca gac aag gaa att gtg tgg gtc atg agg atc act 1152  
Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctc acg aag 1200  
Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctg agc tct gac ctt gtc tac atc atc 1248  
Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile

405

410

415

atc ttc cca cag ctg ctc tgt gta ctc ttc atc aaa gga acc aac act 1296  
Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

tat ggg gca gtt gct ggt tat att ttt gga ctt ttc ctg aga att acc 1344  
Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

gga gga gag cca tat cta tac ttg cag ccc tta atc ttc tac cct ggt 1392

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450

455

460

tat tac cct gac aag aat ggt ata tac aat cag agg ttc cca ttt aaa 1440

Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys

465

470

475

480

act ctc tcc atg gtt acc tca ttc ttt acc aac att tgt gtt tcc tat 1488

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr

485

490

495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cct cca aaa tta gat 1536

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

ata ttt gat gct gtt gtc tca agg cac agt gaa gag aac atg gac aag 1584

Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515

520

525

acc att cta gtc aga aat gaa aac atc aaa tta aat gaa ctt gca cct 1632

Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro

530

535

540

gta aag cct cga cag agc cta acc ctc agt tca act ttc acc aat aaa 1680

Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

545

550

555

560

gag gct ctc ctt gat gtt gat tcc agt cca gag gga tct ggg act gaa 1728

Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

gat aac tta caa tga

1743

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> rat

<400> 4

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1

5

10

15

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20

25

30

Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65

70

75

80

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr

165

170

175

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

His Pro Val Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp

225

230

235

240

Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala

275

280

285

Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400



Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile  
405 410 415

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr  
420 425 430

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
435 440 445

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
450 455 460

Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys  
465 470 475 480

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
485 490 495

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
500 505 510

Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
515 520 525

Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
530 535 540

Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

545

550

555

560

Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 5

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)

<223> choline transporter from human

<400> 5

atg gct ttc cat gtg gaa gga ctg ata gct atc atc gtg ttc tac ctt 48

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu

1

5

10

15

cta att ttg ctg gtt gga ata tgg gct gcc tgg aga acc aaa aac agt 96

Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser

20

25

30

ggc agc gca gaa gag cgc agc gaa gcc atc ata gtt ggt ggc cga gat 144

Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp  
35 40 45

att ggt tta ttg gtt ggt gga ttt acc atg aca gct acc tgg gtc gga 192  
Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly  
50 55 60

gga ggg tat atc aat ggc aca gct gaa gca gtt tat gta cca ggt tat 240  
Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr  
65 70 75 80

ggc cta gct tgg gct cag gca cca att gga tat tct ctt agt ctg att 288  
Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile  
85 90 95

tta ggt ggc ctg ttc ttt gca aaa cct atg cgt tca aag ggg tat gtg 336  
Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val  
100 105 110

acc atg tta gac ccg ttt cag caa atc tat gga aaa cgc atg ggc gga 384  
Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly  
115 120 125

ctc ctg ttt att cct gca ctg atg gga gaa atg ttc tgg gct gca gca 432  
Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala  
130 135 140

att ttc tct gct ttg gga gcc acc atc agc gtg atc atc gat gtg gat 480  
Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

atg cac att tct gtc atc atc tct gca ctc att gcc act ctg tac aca 528

Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr

165

170

175

ctg gtg gga ggg ctc tat tct gtg gcc tac act gat gtc gtt cag ctc 576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

ttt tgc att ttt gta ggg ctg tgg atc agc gtc ccc ttt gca ttg tca 624

Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

cat cct gca gtc gca gac atc ggg ttc act gct gtg cat gcc aaa tac 672

His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

caa aag ccg tgg ctg gga act gtt gac tca tct gaa gtc tac tct tgg 720

Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp

225

230

235

240

ctt gat agt ttt ctg ttg ttg atg ctg ggt gga atc cca tgg caa gca 768

Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

tac ttt cag agg gtt ctc tct tct tcc tca gcc acc tat gct caa gtg 816

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttc ggg tgc ctg gtg atg gcc atc cca gcc 864

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala

275

280

285

ata ctc att ggg gcc att gga gca tca aca gac tgg aac cag act gca 912

Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

tat ggg ctt cca gat ccc aag act aca gaa gag gca gac atg att tta 960

Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320

cca att gtt ctg cag tat ctc tgc cct gtg tat att tct ttc ttt ggt 1008

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

ctt ggt gca gtt tct gct gct gtt atg tca tca gca gat tct tcc atc 1056

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

ttg tca gca agc tcc atg ttt gca cgg aac atc tac cag ctt tcc ttc 1104

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

aga caa aat gct tgc gac aaa gaa atc gtt tgg gtt atg cga atc aca 1152

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctg acg aaa 1200

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctc agt tct gac ctt gtt tac atc gtt 1248

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val

405

410

415

atc ttc ccc cag ctg ctt tgt gta ctc ttt gtt aag gga acc aac acc 1296

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

tat ggg gcc gtg gca ggt tat gtt tct ggc ctc ttc ctg aga ata act 1344

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

gga ggg gag cca tat ctg tat ctt cag ccc ttg atc ttc tac cct ggc 1392

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450

455

460

tat tac cct gat gat aat ggt ata tat aat cag aaa ttt cca ttt aaa 1440

Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys

465

470

475

480

aca ctt gcc atg gtt aca tca ttc tta acc aac att tgc atc tcc tat 1488

Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr

485

490

495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cca cct aaa tta gat 1536

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

gta ttt gat gct gtt gtt gca aga cac agt gaa gaa aat atg gat aag 1584

Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515

520

525

aca att ctt gtc aaa aat gaa aat att aaa tta gat gaa ctt gca ctt 1632

Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu

530

535

540

gtg aag cca cga cag agc atg acc ctc agc tca act ttc acc aat aaa 1680

Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

545

550

555

560

gag gcc ttc ctt gat gtt gat tcc agt cca gaa ggg tct ggg act gaa 1728

Glu Ala Phe Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

gat aat tta cag tga

1743

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 6

<211> 580

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu

1

5

10

15

Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser

20

25

30

Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr

65

70

75

80

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp



145

150

155

160

Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr

165

170

175

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp

225

230

235

240

Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala

275

280

285

Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
305 310 315 320

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
325 330 335

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
340 345 350

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
355 360 365

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
370 375 380

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
385 390 395 400

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val  
405 410 415

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr  
420 425 430

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
435 440 445

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
450 455 460

Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys  
465 470 475 480

Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr  
485 490 495

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
500 505 510

Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
515 520 525

Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu  
530 535 540

Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
545 550 555 560

Glu Ala Phe Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
565 570 575

Asp Asn Leu Gln  
580

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のC.elegans cho-1 (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメ

ガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込み結果を示す図である。

【図 2】

本発明の *C.elegans cho-1* (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の  $\text{Na}^+$  の依存性によるコリン取り込みに対する効果の結果を示す図である。

【図 3】

本発明の *C.elegans cho-1* (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の HC3 によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

【図 4】

本発明のラット CHT1 及び *C. elegans CHO-1* のそれぞれのアミノ酸配列を示す図である。

【図 5】

*C. elegans* の神経系で本発明の *cho-1::gfp* を発現している神経細胞の分布を示す図である。

【図 6】

$\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を示す図である。

【図 7】

本発明のラット CHT1 の予想されるトポロジーを示す図である。

【図 8】

本発明のラット組織での CHT1 mRNA 転写産物のノザン解析の結果を示す図である。

【図 9】

本発明のラット脳における CHT1 転写産物の *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図 10】

本発明の脊髄における CHT1 転写産物の *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図 11】

本発明の CHT1 cRNA または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コ

リンの取り込みの結果を示す図である。

【図 1 2】

本発明の CHT1 のコリン濃度によるコリン取り込みに対する効果を示す図である。

【図 1 3】

本発明の CHT1 の HC3 によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

【図 1 4】

本発明の CHT1 の  $\text{Na}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  依存性によるコリン取り込みの結果を示す図である。

【図 1 5】

本発明の CHT1 cDNA あるいはベクター pcDNA3.1 をそれぞれ導入した COS7 細胞から調製した膜への  $[^3\text{H}]$  HC3 結合結果を示す図である。

【図 1 6】

本発明の CHT1 cDNA あるいはベクター pcDNA3.1 をそれぞれ導入した COS7 細胞から調製した膜への特異的  $[^3\text{H}]$  HC3 結合の飽和解析の結果を示す図である。

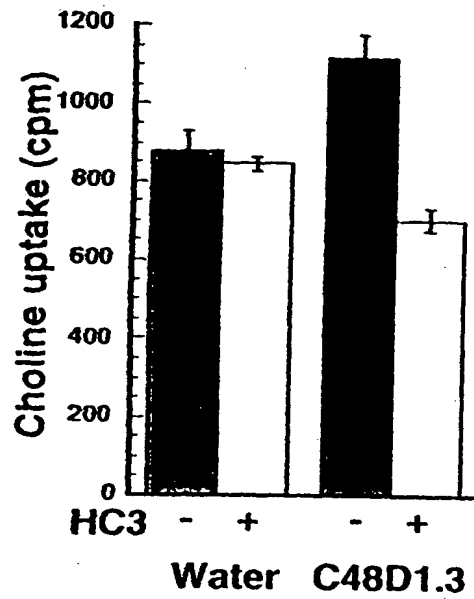
【図 1 7】

本発明の HC3、コリン (Cho)、アセチルコリン (Ach) による特異的  $[^3\text{H}]$  HC3 結合の置換の結果を示す図である。

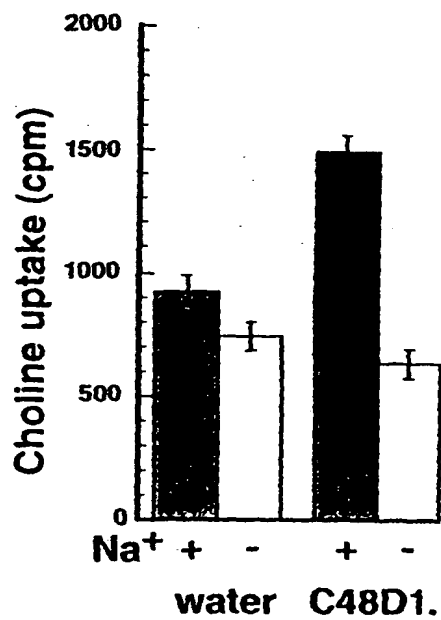
【書類名】

図面

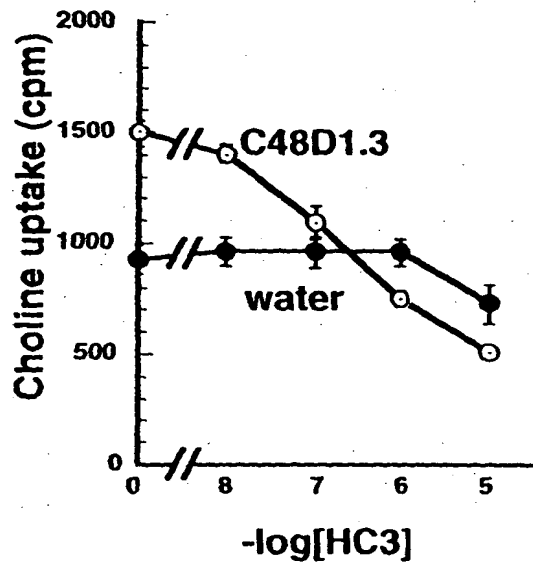
【図 1】



【図 2】



【図 3】

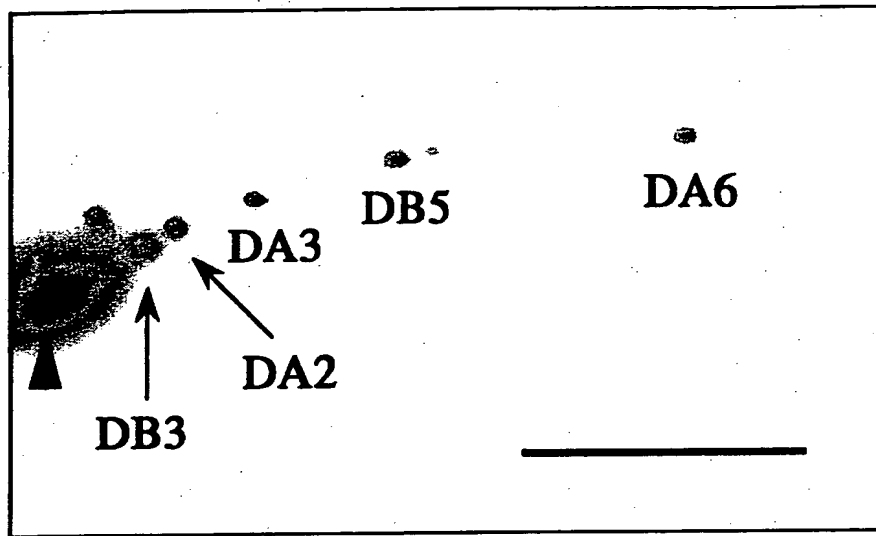


【図 4】

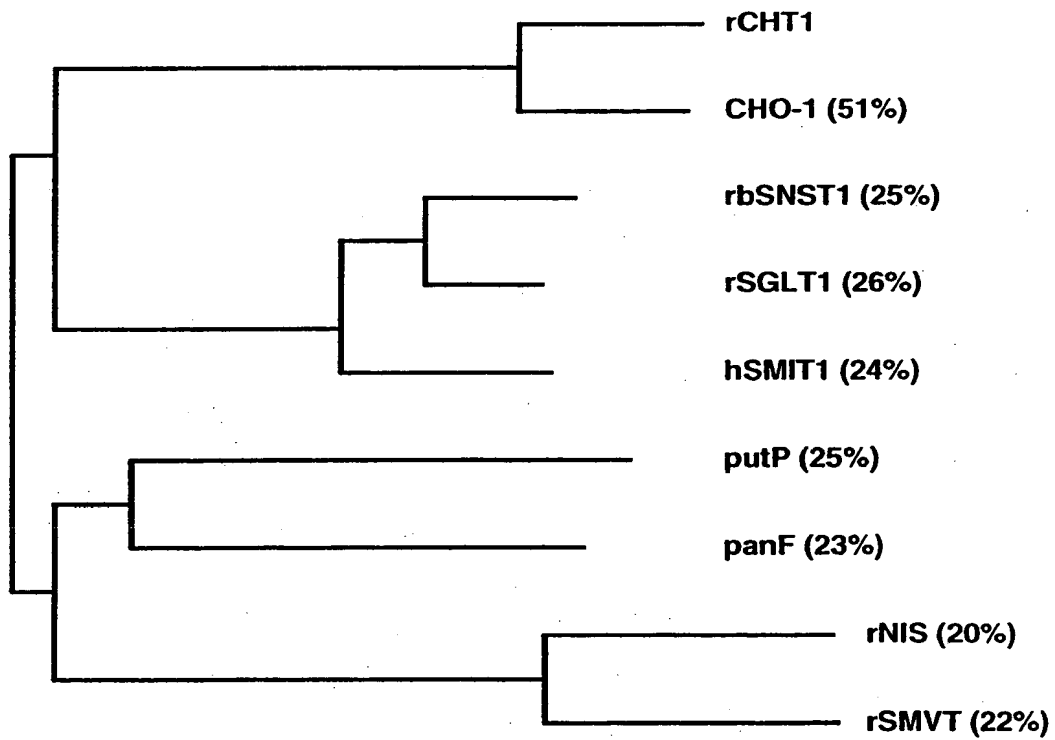
CHT1	MPFHVEGLVAIIIFYLLIFLVGIWAAMKTKNS-----GNAEERSEATTVGGRDIGLLVGGF	56
cht-1	-MADLLGIVATVFFYYLLIFLVGIWAGRKSSSKELESEAGAATEEVMLAGRNIGTLVGIF	59
I		
CHT1	TMTATWVGGGYINGTAEAVYGPCCGLAWAQAPIGYSLIILGGFFAKPMRSKGYVTMLD	116
cht-1	TMTATWVGGAINGTAEALYNG--GLLGCAAPVGYATSLVGGFLFAKIMREEGYITMLD	117
II		
CHT1	PFQIIYGKRGGLLETPALMGVFWAAAIISALGATISVIIIDVDVNIISVIYSALIAITLYT	176
cht-1	PFQHKYGQRIGGLMYVPALLGETIFWTAAILISALGATISVIIIGIDVNASVTISACIAVFYT	177
III IV		
CHT1	LVGGLYSVAYTDVVQLFCIFGLWISVPFALSHPVVTDIGFTAVHAKYQSPWLGTTES-V	235
cht-1	ETGGYYAVAYTDVVQLFCIFGLWVCVPAAMVDGAKDISRNAG-----DWIGETGGFK	231
V		
CHT1	EVYTNLDNELLMLGGIPWQAYFORVLSSSSATYAQVLSFLAAGGLVMAIPAICIGATG	295
cht-1	ETSLNIDCMELLVGGIPWQVYFORVLSSKTAHGAQTLSEVAGVGCHLMAIPPALIGATA	291
VI VII		
CHT1	ASTDWNQIAYGFDPKTKKEAD-----MILPPIVLYQLCPVYLSFEGLGAVSAAVMSSAD	349
cht-1	RNTDWRMTDYSPWNGTKVESIPDPKRMVYPLVFQYLTPIWAFIIGLGAVSAAVMSSAD	351
VIII		
CHT1	SSILSASSMFARNIYQLSFRONASDKEIWMRITVEVFGASATAMALLTKIYGLWYLS	409
cht-1	SSVLSAASMFANHNIWKLIRPEASEKEVITVMRIATTCVGIMATIMALTIOSIYGLWYLC	411
IX		
CHT1	SDLVYIIIFPQLLCVLEIKGTINTYGAVAGYIFGLFLRITGGEPYIYLQPLIFYPGYYPDK	469
cht-1	ADLVYVILFPQLLCVYMPRSNTYGSLAGYAVGLVLRITGGEPVLSLPAFFHYPMYT--D	469
X XI		
CHT1	NGIYNQRFPEKTLSMYISFFTNICVSYLAKYLFESGTLPPKLDITEDAVVSR---HSEENM	526
cht-1	G---VQYFPERITAMLESSMATIYIVSIQSEKLFKSGRLSPEDVMGCVNIPIDHVPLPS	526
XII		
CHT1	DKITILVRNENIKLNELAPVKPRQSLTSSFTINKEALLDVDSSPEGSGTIEDNLQ	580
cht-1	DVSFAVSSE--TLNMKAPNGTPAPVHPNQPSDENTLLHPYSQSYSTNSN--	576



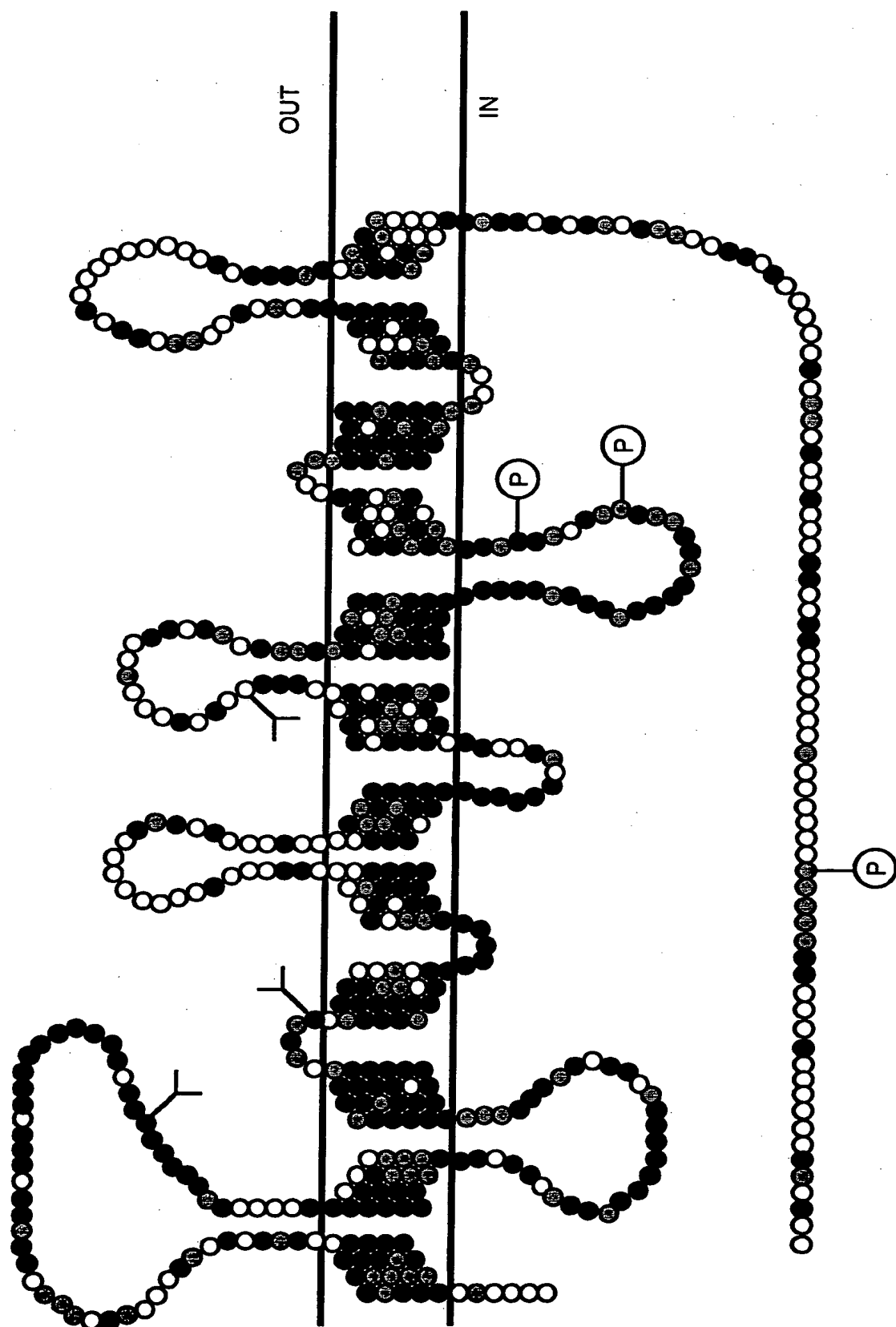
【図 5】



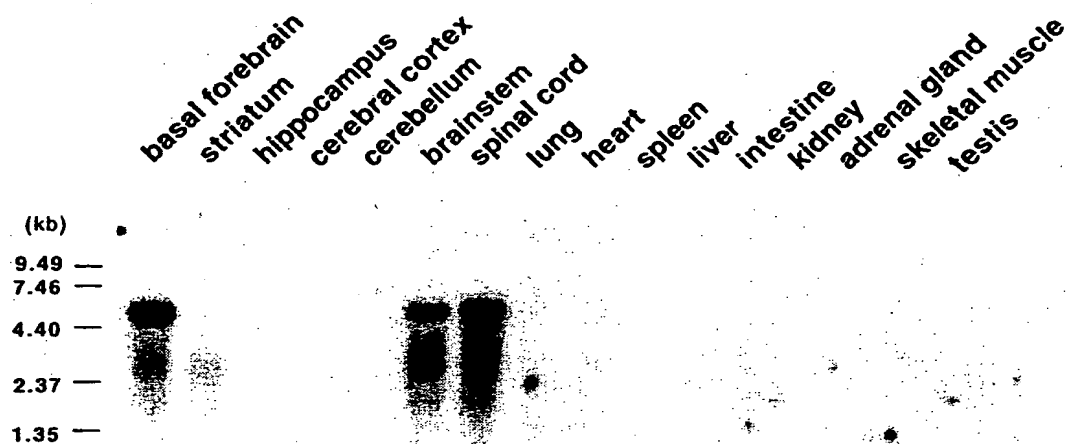
【図 6】



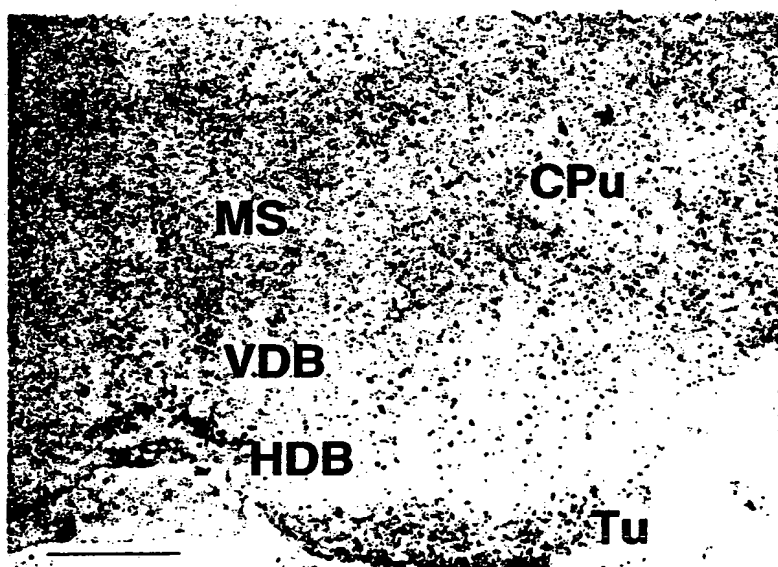
【図 7】



【图 8】



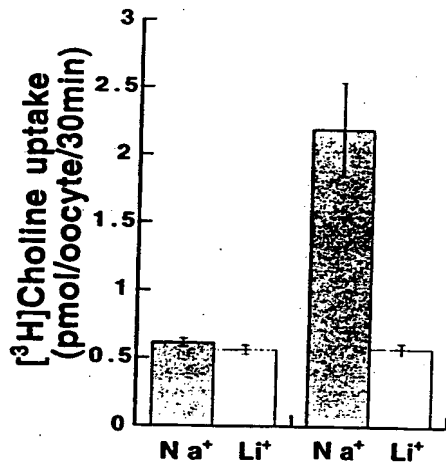
【图 9】



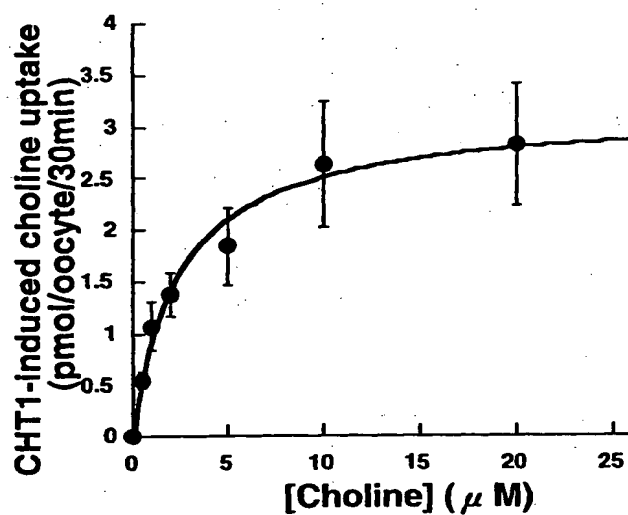
【図 10】



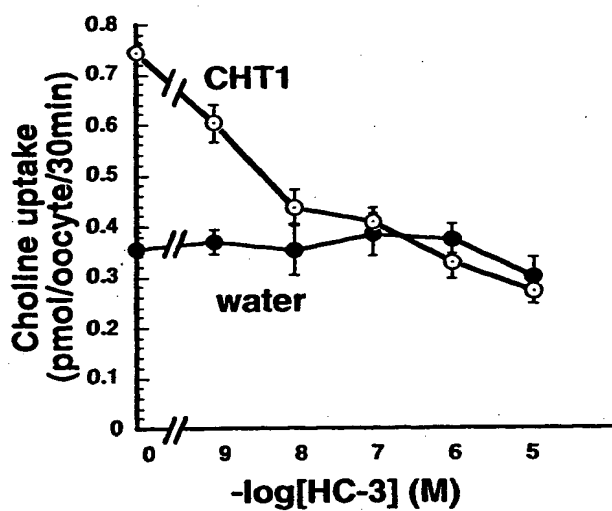
【図 11】



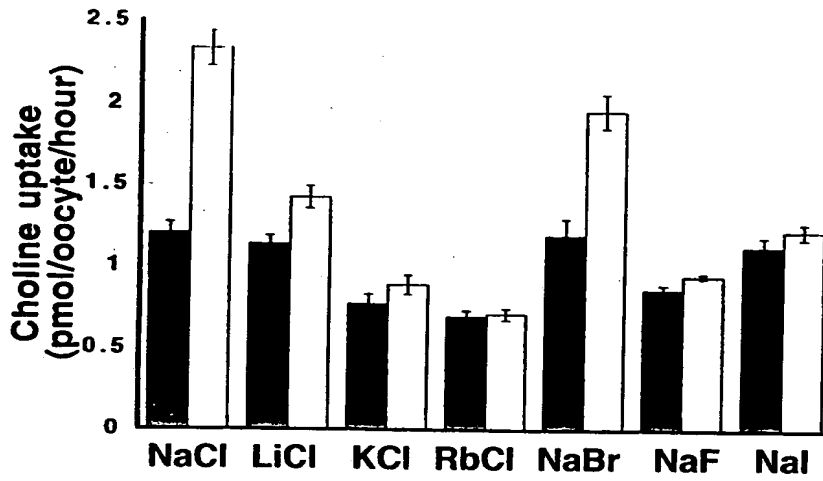
【図 1 2】



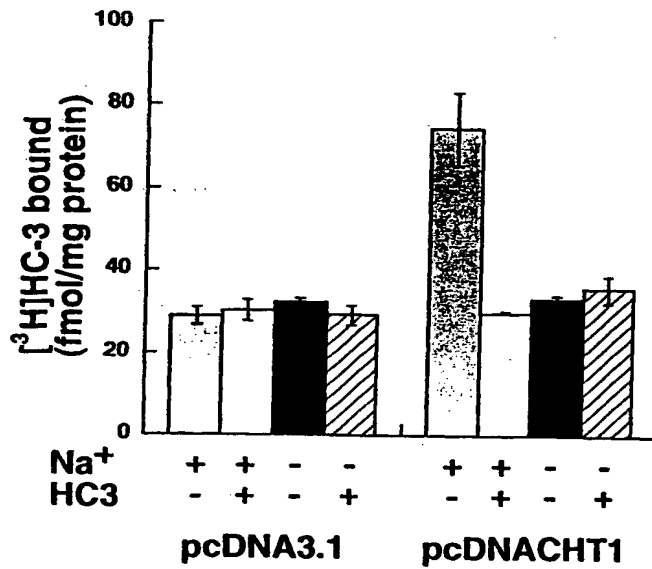
【図 1 3】



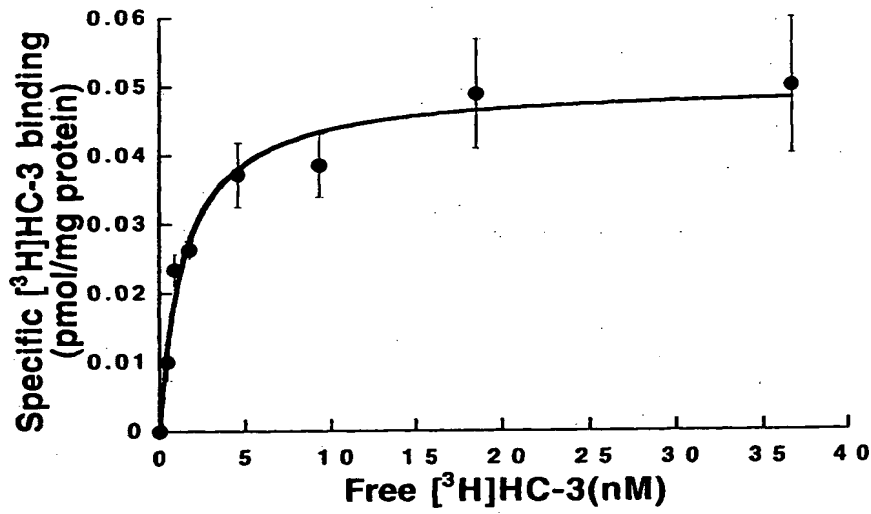
【図 14】



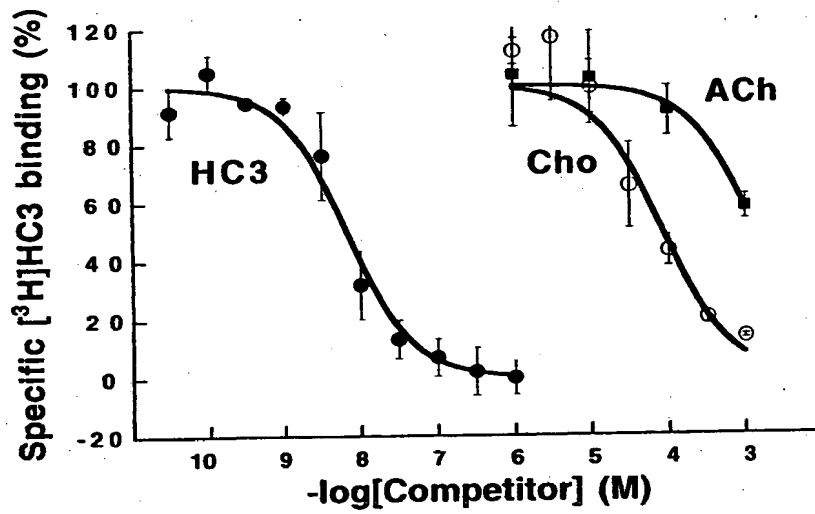
【図 15】



【図 16】



【図 17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】 線虫*C. elegans*のゲノム配列から予測される $\text{Na}^+$ 依存性トランスポーターcDNAについてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターのcDNA (cho-1) を同定し、このcDNAとの塩基配列の相同性を指標にラット脊髄からラット高親和性コリントランスポーターのcDNA (CHT1) をクローニングする。同様に、ヒトゲノムからヒト高親和性コリントランスポーターのcDNAをクローニングする。

【選択図】 図4



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

